

Т. Н. Атяшева, А. Л. Маленёв, Р. А. Горелов, А. А. Клёнина, А. Г. Бакиев

ВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ СВОЙСТВ ЯДОВИТОГО СЕКРЕТА У ГАДЮК ВОЛЖСКОГО БАССЕЙНА

Волжский бассейн населяют гадюки двух видов — восточная степная гадюка *Vipera renardi* и обыкновенная гадюка *Vipera berus*. В статье приведены сведения о возрастных различиях биохимических свойств ядовитого секрета гадюк. Для каждого вида в отдельности показано, что в ядовитом секрете новорожденных гадюк активность протеаз статистически значимо выше, чем в яде взрослых особей. Все образцы яда новорожденных восточных степных гадюк оказались бесцветными, с нулевой активностью оксидазы L-аминокислот. Все образцы яда новорожденных обыкновенных гадюк были желтого цвета, но, по сравнению со взрослыми, с меньшей активностью оксидазы L-аминокислот. Библиогр. 11 назв. Табл. 3.

Ключевые слова: *Vipera renardi*, *Vipera berus*, ядовитый секрет, протеаза, оксидаза L-аминокислот.

T. N. Atyasheva, A. L. Malenyov, R. A. Gorelov, A. A. Klenina, A. G. Bakiev

AGE DIFFERENCES IN THE PROPERTIES OF VIPEROUS SNAKE VENOM OF THE VOLGA RIVER BASIN

Institute of Ecology of Volga river Basin RAS, 10, ul. Komzina, Togliatti, 445003, Russian Federation; makatania@yandex.ru, malenyov@mail.ru, gorelov.roman@mail.ru, colubrida@yandex.ru, herpetology@list.ru

The Volga river basin is inhabited by two species of vipers: eastern steppe viper *Vipera renardi* and the common adder *V. berus*. The article provides information about the age differences of biochemical properties of viper's snake venom. It also shows for each species that the protease activity in the snake venom of newborn vipers is significantly higher than in that of adults. All venom samples of the newborn eastern steppe vipers were colorless, with zero activity of L-amino acid oxidase. All venom samples of the newborn common adders were yellow in color, but in comparison with adults they have less active L-amino acid oxidase. Refs 11. Tables 3.

Keywords: *Vipera renardi*, *Vipera berus*, snake venoms, protease, L-amino acid oxidase.

Семейство гадюковых Viperidae в настоящее время представлено в Волжском бассейне двумя видами. Это — восточная степная гадюка *Vipera renardi* и обыкновенная гадюка *Vipera berus* из подсемейства Viperinae, о свойствах ядовитого секрета которых в литературе [1, 2 и др.] собрано достаточно много сведений, но последние касаются в основном свойств яда взрослых особей. В доступных источниках найдены лишь отрывочные сведения, касающиеся ядовитого секрета сеголетков этих видов гадюк [3, 4]. Возрастные различия в свойствах ядовитого секрета гадюковых ранее отмечались в литературе, но эти данные получены на змеях из подсемейства Crotalinae [5, 6], что не позволяет представить общую картину онтогенетических изменений ядовитого секрета в семействе Viperidae.

Целью данной работы стал анализ возрастных различий свойств ядовитого секрета гадюк *Vipera berus* и *Vipera renardi*, населяющих бассейн Волги.

Т. Н. Атяшева (makatania@yandex.ru), А. Л. Маленёв (malenyov@mail.ru), Р. А. Горелов (gorelov.roman@mail.ru), А. А. Клёнина (colubrida@yandex.ru), А. Г. Бакиев (herpetology@list.ru): Институт экологии Волжского бассейна РАН, Российская Федерация, 445003, Тольятти, ул. Комзина, 10.

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2016

Материал и методика

Гадюк отлавливали в мае-июле 2013–2014 гг. на территории Самарской и Волгоградской областей (табл. 1). В течение пяти-семи дней змей передерживали в лаборатории в террариумах, затем производили отбор яда, после чего гадюк выпускали в места отлова. В лаборатории оставляли только беременных самок с целью получения от них потомства.

Таблица 1. Места отлова гадюк

Вид	Место отлова	Количество (n)	
		взрослые	сеголетки
<i>Vipera renardi</i>	Волгоградская обл., Камышинский район, окрестности с. Верхняя Добринка	20	16
<i>Vipera berus</i>	Самарская обл., г. Самара, Красноглинский район	13	6

В данном исследовании мы использовали только индивидуальные образцы ядовитого секрета как взрослых, так и новорожденных гадюк. Для этого яд от каждой взрослой особи собирали в отдельные чашки Петри и анализировали отдельно. У детенышей ядовитый секрет собирали на предметные стекла с зашлифованной кромкой через 10–14 дней после рождения. Затем образцы яда в течение двух недель высушивали в эксикаторе над хлористым кальцием и хранили в холодильнике. В конце сезона (конец августа — начало сентября) все самки вместе с потомством были выпущены в место отлова.

Определение протеолитической активности проводили колориметрически с использованием в качестве субстрата казеина коровьего молока («Sigma Aldrich»). Инкубационная смесь состояла из 300 мкл раствора яда (0,5–0,6 мг/мл) и 300 мкл 2 %-ного казеина на 0,04М Трис-НСl буфере (рН 8,2). Реакцию проводили 30 мин при температуре 37,0 °С, останавливали добавлением двойного объема 5 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и осадок отделяли центрифугированием [7]. Продукты реакции, содержащиеся в супернатанте и не осаждаемые трихлоруксусной кислотой, окрашивали реактивом Фолина (0,5 мл 0,5 N) и измеряли их оптическую плотность при длине волны 670 нм на спектрофотометре ПЭ-3000УФ (Россия). За единицу протеолитической активности принято такое количество препарата, которое, действуя в течение 1 мин на 2 %-ный раствор субстрата при 37 °С и рН 8,2, образует продукты гидролиза, не осаждаемые трихлоруксусной кислотой, в количестве, эквивалентном 1 мкмоль L-тирозина [8]. В настоящей статье приведены значения удельной протеолитической (казеинолитической) активности, выраженной в мкг образовавшегося тирозина за одну минуту в пересчете на 1 мг белка.

Активность оксидазы L-аминокислот в ядовитом секрете гадюк определяли с помощью L-фенилаланина в качестве субстрата [9]. Реакционная смесь содержала 0,2 мл 0,4М Трис-НСl буфера (рН 7,5), 0,1 мл раствора каталазы (1 мг/мл), 0,05 мл раствора яда (рабочей концентрации 0,5–0,6 мг/мл). Реакцию запускали добавлением 0,1 мл 0,04М раствора L-фенилаланина. Смесь инкубировали в течение 15 мин при температуре 37 °С, при частом и интенсивном механическом встряхивании микропипеток. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 25 %-ного раствора ТХУ и выдерживали 20 мин до полного формирования осадка, после чего пробы цен-

трифугировали. К 0,5 мл супернатанта добавляли 2,5 мл 1М Трис-боратного буфера (рН 6,5) и полученную смесь выдерживали 30 мин, после чего измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 300 нм на спектрофотометре «ПЭ-3000УФ». За одну единицу активности (Е) принимали такое количество фермента, которое давало поглощение 0,030 ед. оптической плотности при 300 нм. Данная единица соответствует количеству фермента, которое в аналогичных условиях катализирует выделение 1 мкл кислорода за 30 мин, измеренное ранее манометрическим способом [10]. Удельную активность фермента выражали в Е/мг белка в мин.

Результаты

Активности ферментов в индивидуальных образцах ядовитого секрета гадюк обоих видов отражены в табл. 2 и 3. Данные о ферментативных активностях яда степных гадюк, опубликованные нами ранее [3], приведены с уточнениями.

Таблица 2. Активность протеаз в яде взрослых и новорожденных гадюк

Вид	Возрастная группа	n	Активность протеаз, мкг тир / мг белка в мин		t _ф	P
			lim	M±m		
<i>Vipera renardi</i>	взрослые	20	48,6–110,3	82,5±3,05	4,350	<0,001
	новорожденные	16	71,2–173,6	109,3±5,75		
<i>Vipera berus</i>	взрослые	13	10,5–61,0	19,0±3,79	7,931	<0,001
	новорожденные	6	59,4–90,8	71,0±5,03		

Таблица 3. Окраска яда новорожденных и взрослых гадюк и активность оксидазы L-аминокислот в нем

Вид	Возрастная группа	n	Соотношение образцов разного цвета, %		Активность оксидазы L-аминокислот, Ед / мг белка в мин		t _ф	P
			желтый	бесцветный	lim	M±m		
Vipera renardi	взрослые	20	80,0	20,0	0,0–19,7	7,2±1,35	4,756	<0,001
	новорожденные	16	0,0	100,0	0,0–0,0	0,0±0,00		
Vipera berus	взрослые	13	100,0	0,0	16,5–29,5	25,0±0,95	5,082	<0,001
	новорожденные	6	100,0	0,0	12,7–21,7	16,7±1,23		

В яде новорожденных обыкновенных и восточных степных гадюк средние значения активности протеаз статистически значимо выше таковых в ядовитом секрете взрослых особей. Сравнительный анализ средних значений активности оксидазы L-аминокислот также выявил статистически значимые различия: у обоих видов в яде новорожденных змей активность этого фермента ниже по сравнению с ядом взрослых гадюк.

Обсуждение

Активность протеолитических ферментов. Одним из основных компонентов яда гадюковых змей являются протеолитические ферменты, обладающие выраженным трипсино-, тромбино- и калликреиноподобным действием [11]. За счет

действия этой группы ферментов достигается основной токсический эффект от укусов гадюк. Мы предполагаем, что из-за малого количества яда, выделяемого новорожденными гадюками для умерщвления добычи, он должен обладать большей токсичностью, чем яд взрослых особей. Возможно, поэтому активность протеаз в ядовитом секрете новорожденных гадюк отличается повышенным уровнем. В процессе онтогенеза активность протеолитических ферментов становится ниже, достигая уровня взрослых особей. Механизм выявленных возрастных различий нам пока не ясен. Однако в литературе содержатся сведения о том, что онтогенетические различия в токсичности яда и активности ферментов могут быть связаны с изменениями в составе ядовитого секрета [4, 5].

Активность оксидазы L-аминокислот. Известно, что цвет ядовитого секрета у гадюк определяется наличием оксидазы L-аминокислот: чем выше активность данного фермента, тем интенсивнее желтая окраска яда, а в бесцветных образцах ее активность не обнаруживается. Ранее мы отмечали, что активность оксидазы L-аминокислот в яде новорожденных восточных степных гадюк из Волгоградской области отсутствовала, т.е. все полученные образцы были бесцветными. В то же время в выборке взрослых гадюк преобладали особи с желтоокрашенным ядовитым секретом. На данный момент мы затрудняемся объяснить, почему у самок восточной степной гадюки, продуцирующих ядовитый секрет желтого цвета, все детеныши рождаются с бесцветным ядом.

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что все новорожденные обыкновенные гадюки *Vipera berus*, как и взрослые особи, продуцируют желтоокрашенный яд, но активность оксидазы L-аминокислот ядовитого секрета новорожденных значительно ниже. По-видимому, у обыкновенных гадюк цвет ядовитого секрета определяется с момента рождения, а активность оксидазы L-аминокислот меняется с возрастом.

Выявленные различия в активности ферментов ядовитого секрета взрослых и новорожденных особей восточной степной и обыкновенной гадюк носят сходный характер. У каждого из видов в процессе онтогенеза происходит снижение активности протеолитических ферментов и рост активности оксидазы L-аминокислот.

Литература

1. Кукушкин О.В., Бакиев А.Г., Маленёв А.Л. Некоторые биохимические характеристики яда степной гадюки из Феодосийских степей (Крым) // Известия Самарского научного центра РАН. Т. 14, № 1. 2012. С. 158–162.
2. Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Гелаишвили Д.Б., Горелов Р.А., Доронин И.В., Зайцева О.В., Зиненко А.И., Клёнина А.А., Макарова Т.Н., Маленёв А.Л., Павлов А.В., Петрова И.В., Ратников В.Ю., Старков В.Г., Ширяева И.В., Юсупов Р.Х., Яковлева Т.И. Гадюки (Reptilia: Serpentes: Viperidae: *Vipera*) Волжского бассейна. Часть 1. Тольятти: Кассандра, 2015. 234 с.
3. Маленёв А.Л., Макарова Т.Н., Горелов Р.А. Особенности ядовитого секрета гадюки Ренара (*Vipera renardi*) из Волгоградской области // Известия Самарского научного центра РАН. 2014. Т. 16, № 1. С. 261–265.
4. Nedospasov A. A., Rodina E. V. Age changes of *Vipera berus* venom amidolytic activity // Toxicon. 1992. Vol. 30. P. 1505–1508.
5. Mackessy S. P. Venom ontogeny in the Pacific Rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus* // Copeia. 1988. № 1. P. 92–101.
6. Minton S. A., Weinstein S. A. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamond-back rattlesnake (*Crotalus atrox*) // Toxicon. 1986. Vol. 24. P. 71–80.
7. Murata Y., Satake M., Suzuki T. Studies on snake venom. XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms // J. Biochem. 1963. Vol. 53, no. 6. P. 431–437.

8. Яд гадюки обыкновенной сухой. Временная фармакопейная статья: ВФС 42-3026-98. М., 1998. 23 с.
9. Wellner D., Lichtenberg L. A. Assay of Amino Acid Oxidase // J. Biochem. 1966. Vol. 5, no. 1585. P. 593–596.
10. Wellner D., Meister A. Crystalline L-Amino Acid Oxidase of *Crotalus adamanteus* // J. Biochem. 1960. Vol. 235, N 7. P. 2013–2018.
11. Орлов Б. Н., Гелашвили Д. Б., Ибрагимов А. К. Ядовитые животные и растения СССР. М.: Высшая школа, 1990. 272 с.

Для цитирования: Атяшева Т. Н., Маленёв А. Л., Горелов Р. А., Клёнина А. А., Бакиев А. Г. Возрастные различия свойств ядовитого секрета у гадюк Волжского бассейна // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. 2016. Вып. 3. С. 15–19. DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.303

References

1. Kukushkin O. V., Bakiev A. G., Malenev A. L. *Nekotorye biokhimicheskie kharakteristiki iada stepnoi gadiuki iz Feodosiiskikh stepei (Krym)* [Some biochemical characteristics of steppe viper venom from Theodosiyan steppes (the Crimea)]. *Izvestiia Samarskogo nauchnogo tsentra RAN [News of the Samara centre of science of the Russian Academy of Sciences]*, 2012, vol. 14, no. 1, pp. 158–162. (In Russian)
2. Bakiev A. G., Garanin V. I., Gelashvili D. B., Gorelov R. A., Doronin I. V., Zaitseva O. V., Zinenko A. I., Klenina A. A., Makarova T. N., Malenev A. L., Pavlov A. V., Petrova I. V., Ratnikov V. Iu., Starkov V. G., Shirinaeva I. V., Iusupov R. Kh., Iakovleva T. I. *Gadiuki (Reptilia: Serpentes: Viperidae: Vipera) Volzhskogo basseina. Chast' 1* [Vipers (Reptilia: Serpentes: Viperidae: Vipera) of the Volga river Basin. Part 1]. Tol'iaty, Kassandra, 2015. 234 p. (In Russian)
3. Malenev A. L., Makarova T. N., Gorelov R. A. Osobennosti iadovitogo sekreta gadiuki Renara (*Vipera renardi*) iz Volgogradskoi oblasti [Some characteristics of the venom of renards viper (*Vipera renardi*) from the Volgograd region]. *Izvestiia Samarskogo nauchnogo tsentra RAN [News of the Samara centre of science of the Russian Academy of Sciences]*, 2014, vol. 16, no. 1, pp. 261–265. (In Russian)
4. Nedospasov A. A., Rodina E. V. Age changes of *Vipera berus* venom amidolytic activity. *Toxicon*, 1992, vol. 30, pp. 1505–1508.
5. Mackessy S. P. Venom ontogeny in the Pacific Rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia*, 1988, no. 1, pp. 92–101.
6. Minton S. A., Weinstein S. A. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamond-back rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon*, 1986, vol. 24, pp. 71–80.
7. Murata Y., Satake M., Suzuki T. Studies on snake venom. XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms. *J. Biochem.*, 1963, vol. 53, no. 6, pp. 431–437.
8. *Iad gadiuki obyknovennoi sukhoi. Vremennaia farmakopeinaia stat'ia: VFS 42-3026-98* [Dry venom of common adder. Temporary Pharmacopeial Article: TPA 42-3026-98]. Moscow, 1998. 23 p. (In Russian)
9. Wellner D., Lichtenberg L. A. Assay of amino acid oxidase. *J. Biochem.*, 1966, vol. 5, no. 1585, pp. 593–596.
10. Wellner D., Meister A. Crystalline L-amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus*. *J. Biochem.*, 1960, vol. 235, no. 7, pp. 2013–2018.
11. Орлов Б. Н., Гелашвили Д. Б., Ибрагимов А. К. *Iadovitye zhivotnye i rasteniia SSSR* [Poisonous animals and plants of the USSR]. Moscow, Vysshiaia shkola Publ., 1990. 272 p. (In Russian)

For citation: Atyasheva T. N., Malenyov A. L., Gorelov R. A., Klyonina A. A., Bakiev A. G. Age differences in the properties of viperous snake venom of the Volga river basin. *Vestnik of Saint Petersburg University. Series 3. Biology*, 2016, issue 3, pp. 15–19. DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.303

Статья поступила в редакцию 11 января 2016 г., принята 17 мая 2016 г.

Сведения об авторах:

Атяшева Татьяна Николаевна — инженер-исследователь
 Маленёв Андрей Львович — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией
 Горелов Роман Андреевич — аспирант
 Клёнина Анастасия Александровна — младший научный сотрудник
 Бакиев Андрей Геннадьевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Atyasheva Tatyana N. — engineer-researcher
 Malenyov Andrey L. — PhD, head of laboratory
 Gorelov Roman A. — Postgraduate student
 Klyonina Anastasiya A. — junior researcher
 Bakiev Andrey G. — PhD, senior researcher